



Kandidaatintutkielma

# Lääkehoidon kehitys keliakian hoitoon

Wenny Santaniemi

Oulun yliopisto  
Biokemian ja molekyyli lääketieteen tiedekunta  
2018



## Sisällys

Käytetyt lyhenteet:.....	4
<b>1. Johdanto .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Keliakian syyt ja seuraukset.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2 Lääkekehitys:.....</b>	<b>8</b>
<b>2. Larazotide Asetaatti .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Rakenne ja kuvaus .....</b>	<b>11</b>
<b>2.2 Patogeneesi .....</b>	<b>12</b>
<b>2.3 Vaikutus: .....</b>	<b>14</b>
<b>3. Nexvax 2 .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Rakenne ja kuvaus .....</b>	<b>15</b>
<b>3.2 Patogeneesi .....</b>	<b>16</b>
<b>3.3 Vaikutus.....</b>	<b>17</b>
<b>4. Latiglutenase .....</b>	<b>18</b>
<b>4.1 Rakenne ja kuvaus .....</b>	<b>18</b>
<b>4.2 Patogeneesi .....</b>	<b>20</b>
<b>4.3 Vaikutus.....</b>	<b>21</b>
<b>5. Yhteenveto.....</b>	<b>23</b>
<b>6. Lähteet.....</b>	<b>25</b>

## Käytetyt lyhenteet:

TH1	T-auttaja-solutyyppi 1 (Type 1 T-helper cells)
HLA	Ihmisen leukosyytti vasta-aine (Human Leucocyte Antigen)
LA	Larazotide Asetaatti (Larazotide Acetate)
tTG	Kudos transglutaminaasi (Tissue Transglutaminase)
TG2	Transglutaminaasi 2
TCR	T-solu reseptori (T-cell receptor)
TJ	Tiukka soluliitos (tight junction)
IgA	Immunoglobuliini A (Immunoglobulin A)
CXCR3	CXC reseptori 3
MYD88	Myeloidinen erilaistumistekijä 88
ZO	Zonula occludent
PAR <sub>2</sub>	Proteaasi-aktivoitu reseptori 2
EGFR	Epidermaalinen kasvutekijäreseptori
CD71	Cluster of differentiation 71
IEL	Intraepiteelisten lymfosyyttien
CD4+	Cluster of differentiation 4 +
IFN- $\gamma$	Interferoni- $\gamma$
TFN- $\alpha$	Tuumorinekroositekijä- $\alpha$
LG	Latiglutenaasi (Latiglutenase)
EP-B2	Kysteiiniendoproteaasi B-isoformi 2
PEP	Prolyyli endopeptidaasi
VH:CrD	Villuksen korkeus ja syvyys suhde. (villus height and crypt depth ratio)

NK-solut

Natural Killer solut. (Natural killer cells)

## 1. Johdanto

### 1.1 Keliakian syyt ja seuraukset

Keliakia on yksi yleisimmistä suoliston autoimmuunisairauksista. Sairaudelle on tyypillistä, että kehon oman immuunipuolustusjärjestelmän TH1 valkosolut reagoivat ravinnosta saatuun viljaproteiini gluteeniin aggressiivisesti (Dias 2017). Tarkemmin ottaen reaktion aiheuttaa gluteenin hajoamisessa suolistoon vapautuvat gliadiinipeptidit. Immuunipuolustuksen reaktio saa aikaan voimakkaan tulehduksen ohutsuolen limakalvolla, joka johtaa suolinukan vaurioon, jolloin ravinteiden imeytyminen ohutsuolessa heikkenee. Keliakialle tyypillisimpiin oireisiin kuuluvat vatsakipu, ripuli, pahoinvointi ja turvotus, sekä väsymys (Mustajoki 2017). Lisäksi monilla potilailla havaitaan painon menetystä ja lapsilla kasvun heikkenemistä, mikä on todennäköisesti seurausta ravinteiden imeytymishäiriön heikkenemisestä. Hoitamattomana sairaus voi aiheuttaa naisilla lapsettomuutta ja hyvin vakavissa tapauksissa jopa kuolemaan. Keliakia on krooninen sairaus, joten sen puhjettua potilas ei kykene siitä parantumaan, mutta sairaudesta aiheutuvia oireita voidaan ehkäistä. Tällä hetkellä ainut olemassa oleva tapa ehkäistä keliakian oireita on tiukkaa gluteenivapaata ruokavalio, jota keliakikon täytyy noudattaa koko loppuelämänsä ajan. Gluteenitonta ruokavaliota noudattava keliakikon keho kykenee korjaamaan immuunireaktion aiheuttamat vahingot suolinukassa noin kolmessa kuukaudessa (Ludvigsson *et al.* 2018). Lisäksi kehossa muodostuvien gluteinipeptidin vasta-aineiden, sekä transglutamaateille spesifiset autovasta-aineiden tasot palautuvat takaisin normaaleihin lukemiin saman aikajakson kuluessa.

Sairautena keliakia on vanha ja ensimmäiset siihen viittaavat kuvaukset ovat kirjattu ylös Kreikassa ajanlaskun ensimmäisen ja toisen vuosisadan välisenä aikana (Losowsky 2008). Sairaus onnistuttiin kuitenkin yhdistämään potilaan ruokavalioon vasta 1880-luvun loppupuolella ja keliakian yhteys viljaan todettiin lähes sata vuotta myöhemmin 1950-luvulla. Samaan aikaan havaittiin sairaudesta johtuvat ohutsuolen vauriot ja ne todettiin osaksi keliakian tautikuvaa.

Tänä päivänä keliakiaan eniten vaikuttavana taudinaiheuttajana pidetään kromosomi 6p21:sta löytyviä ihmisen leukosyytti vasta-aine (HLA) geenejä, jotka tunnetaan nimillä HLA-DQ2 ja HLA-DQ8 (Niida *et al.* 2004). Terveessä ihmisessä vastaavien geenien koodaamat proteiinit esittävät vasta-aineet immuunisoluille. Keliakiaa sairastavalla henkilöllä HLA sitoutuu kuitenkin virheellisesti ruuan sulatuksessa hajonneesta gluteenista vapautuneeseen gliadiiniin ja esittää peptidin immuunipuolustukselle samaan tapaan kuin taudinaiheuttajan (O. Molberg *et al.* 1997). Arviolta 95% keliakiaa sai-

rastavista potilaista on HLA-DQ2 geenin kantajia ja lopusta tapauksista omaa HLA-DQ8 geenin (Koning 2014). Tutkimukset ovat myös osoittaneet, että jo keliakiaa sairastavien potilaiden ensimmäisen asteen sukulaisilla (vanhempi, jälkeläinen tai sisarus) on 20% todennäköisyys sairastua keliakiaan (Ploski *et al.* 1993). Monotsygoottisilla kaksosilla tämä todennäköisyys nousee 75-80% (Belzen *et al.* 2004). Lisätutkimuksissa on kuitenkin havaittu, että arviolta 30% Euroopan väestöstä ovat HLA-DQ2 geenin kantajia, mutta heistä arviolta ainoastaan 4% saa keliakian elämänsä aikana, laskien geenin altistamisriskin 36-53 prosenttiin (Fasano Alessio 2016). Lisäksi näyttäisi siltä, että homotsygoottisella HLA-DQ2 geenin kantajilla on viisinkertainen todennäköisyys sairastua keliakiaan elämänsä aikana heterotsygoottiseen geenin kantajaan verrattuna (Koning 2014). Tutkimuksista saatujen tulosten perusteella ja HLA geenien heikon altistamisriskiprosentin perusteella voidaan olettaa, että keliakian puhkeamiseen vaikuttaa geneettisen altistavan tekijän lisäksi myös jokin ulkoinen tekijä, joka on tutkijoille vielä pääosin tuntematon. Enemmistö tutkijoista kuitenkin uskoo vaikuttavan tekijän löytyvän joko potilaan ympäristöstä tai elintavoista, mutta myös immunologista tekijää pidetään vahvana vaihtoehtona. Tutkijat ovat kuitenkin esittäneen joitain mahdollisia hypoteeseja, kuten lapsen liian aikainen tai myöhäinen altistaminen gluteenille (Lionetti *et al.* 2014, Vriezinga *et al.* 2014) tai rintaruokinnan kesto (Akobeng *et al.* 2006). Yhtenä mahdollisuutena keliakian puhkeamiseen geenin kantajissa pidetään myös potilaan aiemmin sairastamaa infektio tartuntaa (Myléus *et al.* 2012, Plot & Amital 2009). Infektio teoriaa tukee vahvasti eräästä keliakiaan altistavien geenien kannalta homogeenisestä yhteisöstä kerätty data. Kyseisessä Karjalaisessa populaatiossa havaittiin hyvinkin suurta vaihtelua keliakian yleisyydessä populaation sisällä (Abadie *et al.* 2011). Vaihtelun syyksi on ehdotettu aiempaa infektio tartuntaa, jonka seurauksena potilaan TH1 solujen toiminta olisi muuntunut. (Abadie *et al.* 2011, Bouziat *et al.* 2017, Dias 2017) Myöhemmin kahdella erillisellä ihmisen reoviruksella suoritettujen eläinkokeiden tulokset ovat vahvistaneet teoriaa. Tällöin havaittiin, että infektiosta parantuneiden yksilöiden immuuniaktiivisuudessa ilmeni muutoksia, kun nämä altistettiin ruokavalion antigeeneille. Yksi näistä muutoksista aiheutti yksilön TH1 solujen indusoinnin. Infektion osallisuutta keliakian puhkeamiseen tukee myös tilastoissa havaittu keliakikkojen määrän nousu kesällä syntyneiden potilaiden keskuudessa (Ivarsson *et al.* 2003). Tämä tosin viittaisi siihen, että infektio tartunta vaikuttaa puhkeamiseen vain, jos se saadaan elämän varhaisessa vaiheessa.

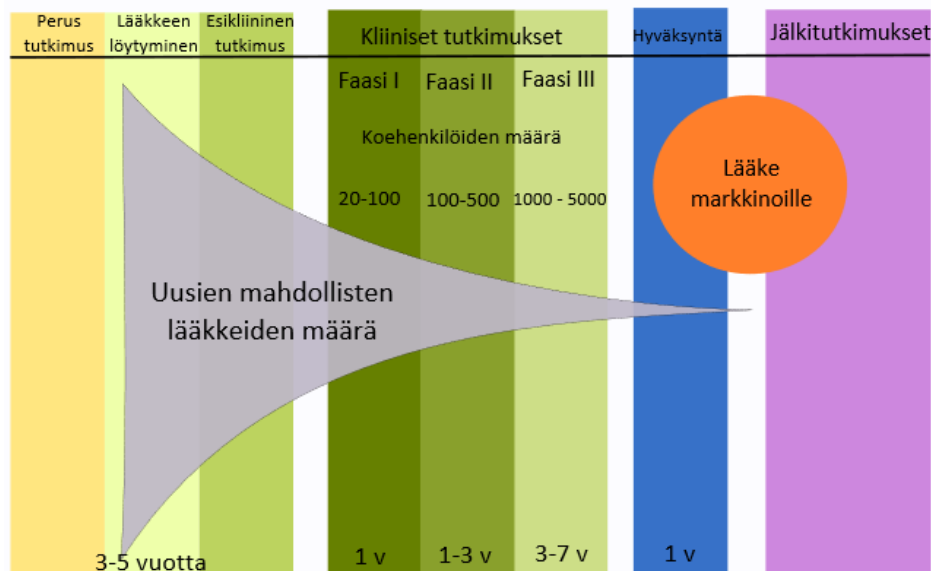
## 1.2 Lääkekehitys:

Uuden lääkkeen kehitysprosessi on pitkä, kallis ja monivaiheinen prosessi, joka vaatii tuhansien tutkijoiden ja potilaiden yhteispanostusta. Tästä syystä uuden lääkkeen päätyminen sitä tarvitsevien potilaiden käyttöön voi viedä vuosia. Keskimäärin tämä prosessi vie 10-16 vuotta (Orion 2018, Prifer 2015, Torjesen Ingrid 2015). Tuotteen turvallisuuden takaamiseksi, ihmiskäyttöön tarkoitettujen lääkeaineiden kehitys on jaettu kolmeen erilliseen vaiheeseen eli faasiin. Jokaisen lääkkeen on täytettävä faasin vaatimukset läpäistävä asetetut kliiniset kokeet ennen kuin seuraavan faasitason tutkimukset voidaan aloittaa. Ennen lääketestauksien aloittamista, tutkijoiden täytyy useimmissa tapauksissa löytää ja tunnistaa sairauden kehitykseen vaikuttava tai oireet synnyttävä tekijä, joka on useimmissa tapauksissa yksi tai useampi proteiini tai geeni (Orion 2018, Torjesen Ingrid 2015). Joissakin hyvin harvoissa tapauksissa hoito sairauteen voidaan löytää vahingossa eri tuloksiin tähtäävän tutkimuksen yhteydessä. Historiallisesti yleisimpiä lääkeaineiden lähteitä ovat olleet erilaiset kasvit, sienet ja merenelävät. Proteiineista ja niiden rakenteesta saadun tiedon lisääntyessä, on tullut yhä yleisempää kehittää täysin uusia lääkemolekyylejä laboratorio-oloissa hyödyntäen tietokoneilla tehtyjä molekyyylimalleja.

Noin 3-5 vuotta kestävä alkututkimuksen jälkeen, uusi lääkeaine on *in vitro* ja soluviljelmissä tai eläinkokeissa suoritettujen *in vivo* kokeiden perusteella riittävän turvallinen ensimmäisen faasin ihmiskokeiden aloittamiseen. (Orion 2018) Tässä vaiheessa lääkkeen nauttimismuoto ja sille ideaalit säilytysolosuhteet ovat vakiintuneet ja lääkeaineen molekyylikrakenteen on todettu olevan riittävän stabiili ja pitkäikäinen sen turvallisuuden ja käytännön hyödyntämisen takaamiseksi (Prifer 2015, Torjesen Ingrid 2015). Ensimmäisen faasin aikana lääkettä testataan ainoastaan pienellä populaatiolla, joka koostuu tavallisesti 20-100 vapaaehtoisesta koehenkilöstä. Syöpälääkkeitä lukuun ottamatta, ensimmäisen faasin koehenkilöt ovat terveitä, eikä heillä ole lääkkeen kohteena olevaa sairautta. Tämä johtuu siitä, että faasi I kokeiden tarkoituksena on taata lääkkeen yleinen turvallisuus ihmiselle ja siihen osallistuvia koehenkilöitä ja heidän reaktioitaan lääkkeeseen tarkkaillaan tarkoin. Ainoastaan noin puolet kliinisiin kokeisiin päässeistä lääkeaineista siirtyvät faasi I jälkeisiin jatkotutkimuksiin.



Faasi II kokeisiin siirryttäessä koehenkilöiden määrä kasvaa 100-500 henkilöön ja heistä jokainen sairastaa lääkkeen kohteena olevaa sairautta. Koehenkilöiden arvoja ja reaktioita lääkkeeseen pidetään hyvin tarkkaan silmällä myös tämän faasin aikana, jotta mahdolliset haittavaikutukset ja sivu-  
 reet saadaan dokumentoi-  
 tua. Faasi II päätarkoituk-  
 sena on kuitenkin var-  
 mistaa, että lääkeaineella  
 on toivottu vaikutus sai-  
 rauteen. Tässä vaiheessa  
 pyritään myös selvittä-  
 mään lääkkeen ideaali  
 annosmäärä ja kuinka  
 koehenkilöiden eri omi-  
 naisuudet (paino, suku-  
 puoli yms.) vaikuttavat  
 annostukseen. Kolman-  
 nessa faasissa lääkettä  
 testataan suurella, muuta-



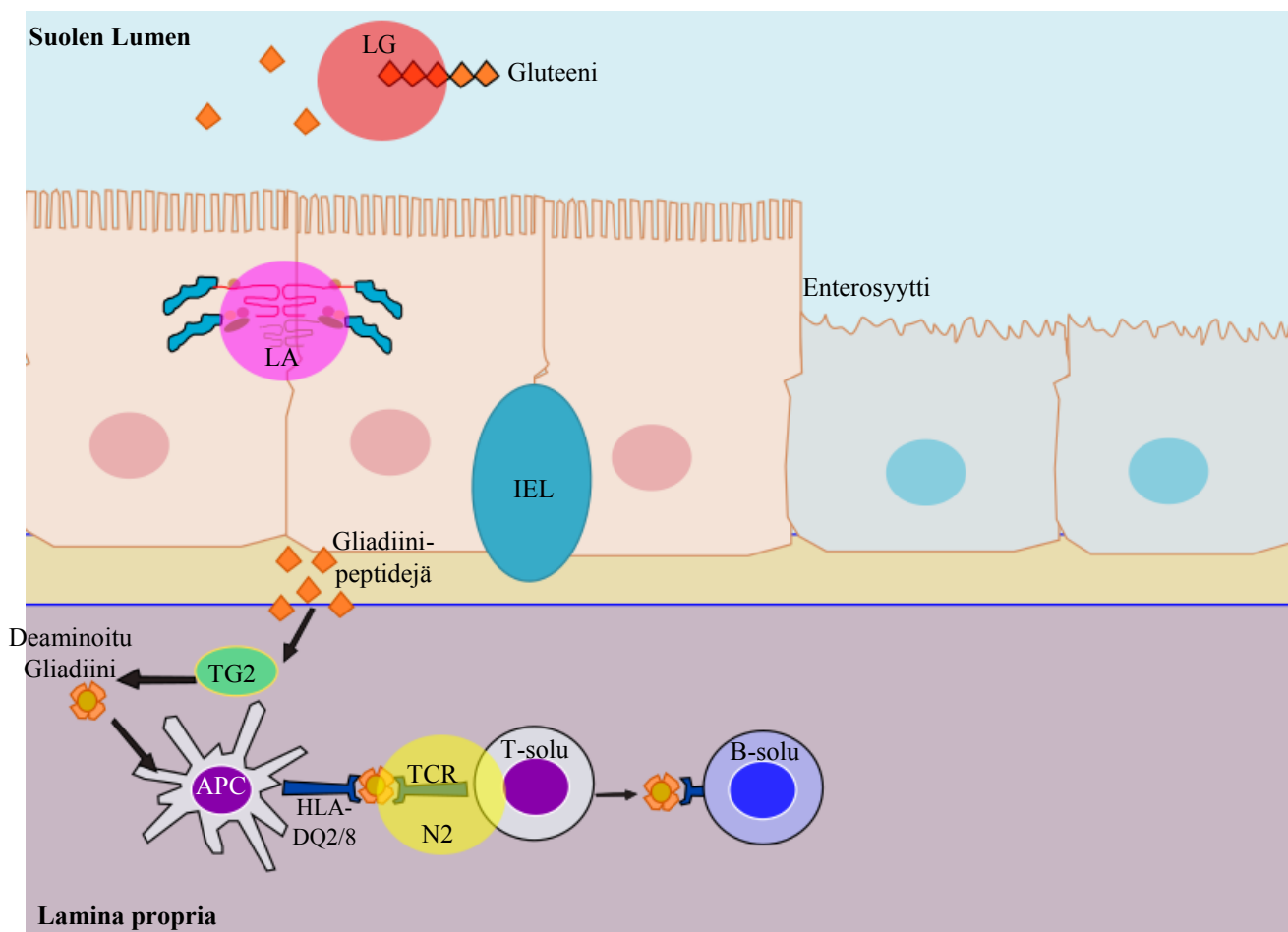
**Kuva 1:** Lääkekehityksen eteneminen verrattuna mahdollisten lääkeaineiden määrään. Uuden lääkkeen vaikutusten seuraamista potilaisiin jatketaan vielä muutamien vuosien ajan sen markkinoille pääsyn jälkeen turvallisuus syistä.

mista tuhansista koehenkilöistä muodostuvalla populaatiolla, jonka osallistujat ovat kotoisin eri puolilta maailmaa. Tämän vaiheen päätarkoituksena on kerätä tilastollisesti merkittävä määrä dataa, jota ei voitu kerätä aiemmista faaseista niiden pienistä osallistujamääristä johtuen. Tässä vaiheessa lääk-  
 keen annostussuosituksia saatetaan vielä muunnella ja mahdollisista sivuvaikutuksista saadaan pa-  
 rempi käsitys. Kolmannen vaiheen tuloksia kerätään noin 2-4 vuotta, jonka jälkeen tulokset julkais-  
 taan. Kolmannen vaiheen kliinisten kokeiden perusteella voidaan lopulta hakea lääkkeen myyntilu-  
 paa.

Viimeisten vuosien aikana keliakiaa vastaan on pyritty kehittämään lääkehoitoa sairautta sairastavien  
 potilaiden elämänlaadun parantamiseksi. Kiinnostus vaihtoehtoiseen lääkehoitoon on potilaiden ta-  
 holta suuri, noin 66% (Tennyson *et al.* 2013). Etenkin vanhemmat (>50 vuotiaat) miehet, sekä keski-  
 vertoa huonommassa rahatilanteessa olevat potilaat osoittivat suurta kiinnostusta hoidolle. Tutkijat  
 myös uskovat keliakiaan sopivan lääkehoidon auttavan muiden immuunisairauksien hoidon kehittä-  
 misessä, sillä keliakia on yksi tähän tutkimustyöhön parhaiten soveltuvista sairauksista. Tämä johtuu  
 siitä, että sairaus on pääosin vain yhden geenin aiheuttama. Lisäksi sairauden aikana muodostuvat ja

sen oireet aiheuttavat gluteenipeptideille spesifiset vasta-aineet ovat hyvin tunnettuja. Suurin osa kehitteillä olevista lääkkeistä on tämän kirjallisuuskatsauksen tekohetkellä lääketestauksen ensimmäisessä tai toisessa vaiheessa (Beyond Celiac 2018). Yksi pisimmälle edenneistä tutkimuksista on Larazotide Asetaatti, jolla oltiin vuoden 2017 kesäkuussa aloittamassa kolmannen faasin kokeet.

Lääkehoitoa keliakiaan pyritään etsimään eri suunnista. Osa lääkeaineista pyrkii ehkäisemään oireita tehostamalla gluteenin hajoamista entsyymiterapioiden avulla, estämällä tTG entsyymiä muokkaamasta gluteenia solun sisällä, keskeyttämällä gluteenin aiheuttaman immuunireaktion täysin tai yksinkertaisesti vähentämällä gluteenin pääsyä kosketuksiin ohutsuolen immuunipuolustuksen solujen kanssa. Osa hoidoista tähtää ainoastaan gluteiinitoman ruokavalion tukemiseen ja oireiden helpottamiseen pienien, vahingossa nautitun gluteenimäärän nauttimisen jälkeen. Toiset tutkimukset tähtäävät puolestaan hoitoon, joka mahdollistaisi kokonaan gluteenivapaasta dieetistä luopumisen.



**Kuva 2:** Tutkielmassa käsiteltyjen lääkeaineiden vaikutusalueet ohutsuolen solukossa. Larazotide Asetaatti (LA) vaikuttaa ohutsuolen epiteelikudoksen tiukkojen liitosten toimintaan (vaaleanpunaisella). Nexvax2 (N2) puolestaan muokkaa valkosolujen toimintaa ja uudelleen ohjelmoi T-solujen reaktion HLA-DQ2:n esittämää gliadiinia kohtaan (alue keltaisella). Latigluteinaasi (LG) puolestaan edistää gluteenin pilkkoutumista suolistossa, jolloin haitallisia peptidejä ei pääse vapautumaan elimistöön.

Kuva: Emma Viitanen & Wenny Santaniemi

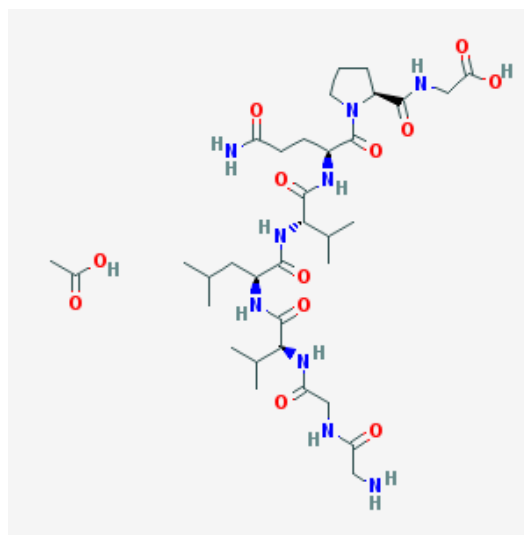
Tässä tutkielmassa keskitytään kolmeen erilaiseen lääkeaineeseen; Larazotide Asetaatti, Netvax2 ja Latiglutenaasi. Kaikki kolme lääkeainetta olivat tutkielman alkaessa saavuttaneet tai vähintään aloittamassa lääketestauksen toisen vaiheen.

## 2. Larazotide Asetaatti

### 2.1 Rakenne ja kuvaus

Larazotide Asetaatti (Larazotide Acetate, tunnetaan myös nimellä AT-001) on syntetinen oraalinen peptidi, joka rakentuu Larazotidesta ja yhdestä etikkahappomolekyylistä (Khaleghi *et al.* 2016, Kim *et al.* 2009, Leffer *et al.* 2015). Molekyyli löydettiin alun perin synteettisestä *Vibrio cholera*-bakteerista. LA:n molekyyli paino on 785.897 g/mol (Kim *et al.* 2009) ja se muodostuu kahdeksasta aminohaposta. LA sitoutuu paikallisesti ohutsuolen enterosyyttien apikaalipintaan, jota esiintyy mikrovillusten kärjissä (Paterson *et al.* 2007). Lääkeaine luokitellaan tiukkojen liitosten säätelijäksi ja sen tähtäimenä on toimia gluteenittoman ruokavalion tukena (Leffer *et al.* 2015).

LA edistää soluliitosten kokoonpanoa, sekä ehkäisee gliadiinin vaikutuksesta tapahtuvan aktiini filamenttien uudelleenjärjestymistä, näin estäen ohutsuolen tiukkojen soluliitosten proteiinirakenteen tuhoutumista ja liitoksen avautumista (Gopalakrishnan, Tripathi *et al.* 2012). Kokeiden perusteella on havaittu, että tämä filamenttien muutos ehkäisee gluteenin kykyä läpäistä ohutsuolen limakalvoa, jolloin siitä vapautuva gliadiini ei pääse kosketuksiin ohutsuolen strooman valkosolujen kanssa, ehkäisten näin keiliakialle tyypillisen tulehdusreaktion laukeamisen (Leffer *et al.* 2015). LA:n on myös todettu lieventävän anti-kudos transglutaminaasin (anti-tTG) vasta-ainearvojen nousua veressä (Khaleghi *et al.* 2016). Näitä vasta-aineita muodostuu kehossa erityisesti



**Kuva 3:** Larazotide Asetaatin 2D rakenne. Suurempi molekyyli on Larazotide, etikkahapon ollessa vasemmalla.

Sekvenssi: GGVLPQG

Molekyylikaava:  $C_{34}H_{59}N_9O_{12}$

Lähde: PubChem, Compound Database;  
CID=44146842

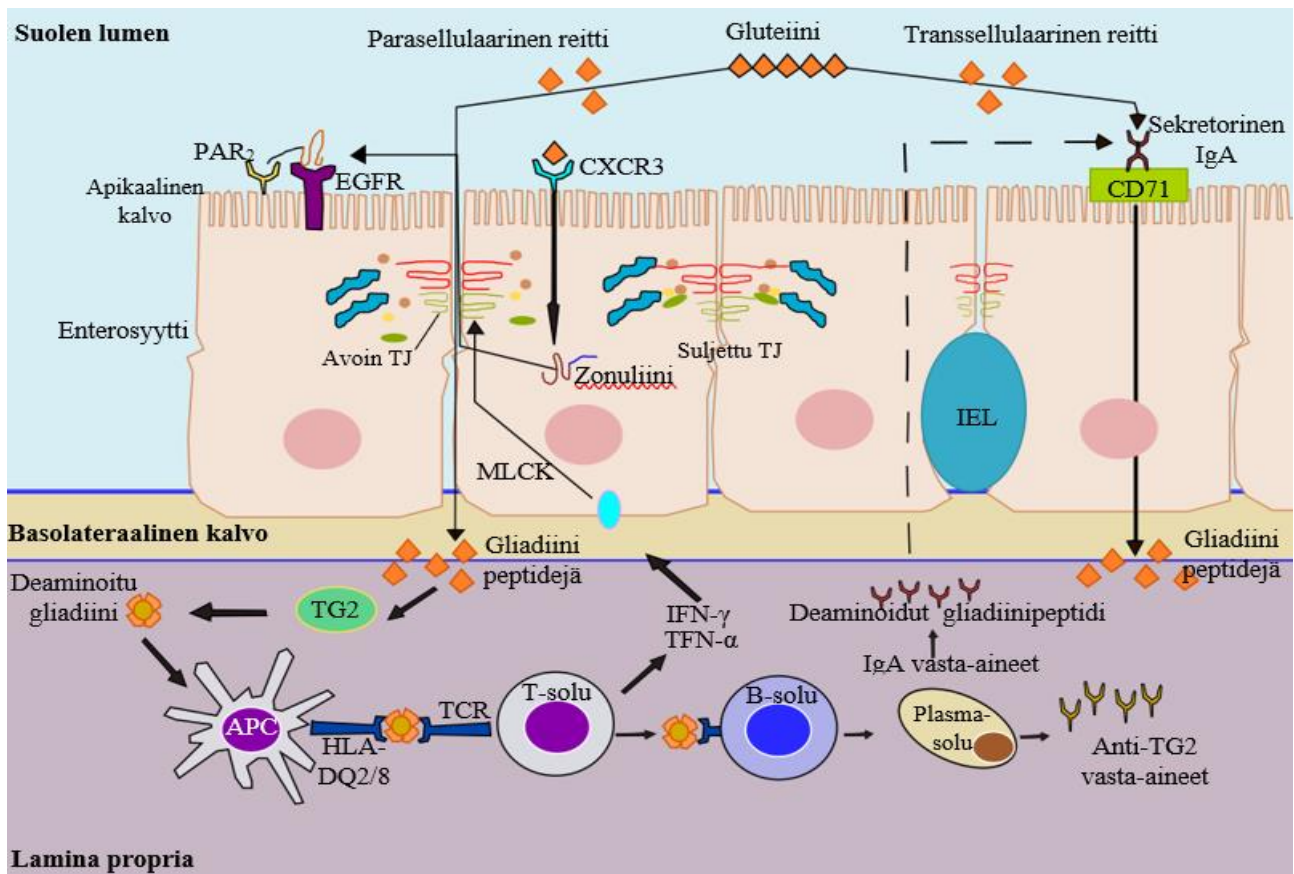
hoitamattoman, pitkittyneen keliakian aikana. LA vaikuttaisi myös alentavan keliakikkojen IFN- $\gamma$ -arvoja, sekä suolen yleistä läpäisevyyttä.

Lääkeaineena LA on käyttäjälleen tämänhetkisten tutkimustulosten perusteella täysin turvallinen. Se on tarkoitettu nautittavaksi ennen gluteenille altistumista, ja on näin ollen ehkäisevä lääke, eikä näin ollen vaikuta taudin oireisiin niiden alkamisen jälkeen.

## 2.2 Patogeneesi

Yksi keliakian laukaisevista tekijöistä on gliadiinipeptidien kulkeutuminen ohutsuolen strooman (lamina propria) lävitse, missä ne pääsevät tekemisiin gluteeniherkkien-solujen kanssa (Khaleghi *et al.* 2016). Tarkka reitti siitä, kuinka gliadiinipeptidit kykenevät kulkeutumaan suolies-teen lävitse on vielä suurimmilta osin tuntematon. Yksi vaihtoehtoista reiteistä kuitenkin esittää, että siirtyminen tapahtuisi kalvokuljetuksen avulla. Transsellulaarisessa reitissä retrotransportin uskotaan käyttävän gliadiiniin sitoutuneita sekretorisia IgA vasta-aineita, joita esiintyy luonnostaan ohutsuolen lumenissa. Tämän jälkeen IgA sitoutuu apikaalisella kalvolla olevaan CD71 reseptoriin, joka laukaisee transsytoosin, CD71 toimiessa reaktion välittäjänä. Transsytoosi ja reseptori helpottavat gliadiinipeptidien kulkeutumista enterosyytin lävitse ohutsuolen stroomaan, lamina propriaan. (Kuva 2)

Gluteenin kulkeutumiselle on tarjottu myös vaihtoehtoista reittiä, jossa ohutsuolen limakalvon immuunipuolustuksen altistuminen gliadiinille laukaisee ketjun, joka johtaa epiteelisten tiukkojen soluliitosten purkautumiseen, sekä tulehdukseen solukossa (Lammers *et al.* 2008, van der Merwe, Jacques Q. *et al.* 2008) (Kuva 2). Keliakian aktiivisessa vaiheessa tämä reaktio käynnistyy, kun gliadiinipeptidit sitoutuvat virheellisesti ohutsuolen epiteelisolukon luminaalipuolella sijaitsevaan kemokiini CXCR3-proteiiniin. Gliadiinin sitoutuminen johtaa sovitinproteiini MYD88 värväämiseen, jonka aktivoitu muoto kykenee vapauttamaan zonuliinin lumeniin. Saavuttaessaan suoliston epiteelikudoksen, zonuliini sitoutuu EGFR:ään ja PAR2:teen. Tämä reaktio johtaa ZO proteiinien fosforylaatioon ja ohutsuolen tiukkojen soluliitosten hajoamiseen.



**Kuva 4:** Gliadiinipeptidien mahdollisesti käyttämät parasellulaarinen ja transsellulaarinen reitti enterosyyttien tiukkojen liitosten (TJ) lävitse. Transsellulaarisessa reitissä IgA:han sitoutuneet gliadiinipeptidit pääsevät kulkeutumaan Lamina propriaan CD71-reseptorin avustuksella. Parasellulaarisessa reitissä gliadiinipeptidit sitoutuvat CXCR3:han, johtaen zonuliinin vapautumiseen. Zonuliini viivyttää PAR<sub>2</sub>:n kautta EGFR:n transaktivaatiota (transactivation), johtaen tiukan sidoksen häiriintymiseen ja osittaiseen avautumiseen. Tämän jälkeen gliadiinit pääsevät kulkeutumaan TJ:n lävitse.

APC: vasta-aineen esittävä solu, CXCR3: CXC-motifreseptori 3, EGFR: epidermaalisen kasvutekijän reseptori, HLA: Ihmisen leukosyytti vasta-aine, IgA: Immunoglobuliini A, IFN- $\gamma$ : Interferoni- $\gamma$ , MYD88: Myeloidinen erilaistumistekijä 88, PAR<sub>2</sub>: Proteaasiaktivoitu reseptori 2, TCR, T-solu reseptori, TG2: Transglutaminaasi 2, TJ: tiivis liitos, TNF- $\alpha$ : Tumoorinekroositekijä- $\alpha$ .

Tekijä: Emma Viitanen, Lähde: (Khaleghi *et al.* 2016)

Molemmille reaktioketjuille on kuitenkin yhteistä se, kuinka gliadiinipeptidit käyttäytyvät saavutettuaan ohutsuolen strooman (Ø Molberg *et al.* 2003). Ne laukaisevat voimakkaan mukautuvan immuunireaktion, jonka aikana gliadiini deaminoituu tTG entsyymien vaikutuksesta. HLA-DQ2 ja -DQ8 antigeeni molekyylit kykenevät tunnistamaan deaminoidussa muodossa olevat gliadiinipeptidit ja

esittävät ne virheellisesti patogeeninä CD4+ T-soluille, jotka alkavat tuottamaan suuria määriä tulehdussytokiineja, kuten IFN- $\gamma$  ja TFN- $\alpha$ . Tämä johtaa ohutsuolen limakalvon vaurioitumiseen, sekä sen surkastumiseen.

## 2.3 Vaikutus:

LA:n pääasiallinen vaikutus on sen kyky inhiboida muutoksia, joita gliadiini ja epiteelisolujen sytokiinit saavat aikaiseksi (Gopalakrishnan *et al.* 2012). LA vahvistaa tiukkojen solusidosten rakennetta ja toimintaa. *In vitro* kokeissa LA:n on havaittu vähentävän FITC-merkattujen gliadinipeptidien läpäisevyyttä epiteelisolujen lävitse jopa 50% verrattuna normaaliin tilanteeseen (Gopalakrishnan, Durai *et al.* 2012).

Vuonna 2015 julkaistussa 2b vaiheen tutkimuksessa, lähes kaikki lääkeainekokeiluun osallistuneista koehenkilöistä kokivat jonkin tason keliakialle tyypillisiä oireita, kuten kaasun muodostumista, sekä vatsa-krampeja ja kipuja (Leffer *et al.* 2015). Osallistujille annetut lääkeaine-määrät kuitenkin vaihtelivat ja lääkeannostuksen määrällä huomattiin olevan vaikutusta oireiden yleisyyteen. Tutkimuksessa havaittiin pienimmän annoksen, 0.5mg, huomattavasti vähentävän edellä mainittuja oireita lumelääkeryhmään verrattaessa. Kontrolliryhmään verratessa, optimaalista annosta saavien potilaiden vatsaoireiden vakavuusarvot pysyivät >50% matalampina kokeen ensimmäisen puoliskon aikana tai kauemmin. Lääkkeen ”tosielämän tilanteeseen” sopivaa annosta ei kuitenkaan kyetä vielä arvioimaan, sillä tuloksissa huomattiin eroja saadun gluteeniannoksen määrän vaihdellessa (Khaleghi *et al.* 2016, Leffer *et al.* 2015). Larazotide asetaatin havaittiin vähentävän koehenkilöissä myös keliakian vähemmän tyypillisiä oireita kuten päänsärkyä ja väsymystä. Tämän arvioidaan johtuvan ohutsuolessa vähentyneestä paikallisen tulehduksesta, jonka seurauksesta kehoon vapautuvan sytokiinin arvot laskivat.

Useammista tutkimuksista saatujen tulosten perusteella vaikuttaisi siltä, että Larazotide asetaatilla olisi käänteinen annosvaikutus (Khaleghi *et al.* 2016). Tämä tarkoittaa sitä, että lääkkeen annosmäärän kasvattaminen vähentää sen vaikutuksen tehoa. Samanlainen vaikutus on havaittavissa myös muillakin suun kautta otettavilla imeytymättömillä peptidipohjaisilla lääkeaineilla, kuten Linaclotidella (Chey *et al.* 2012, Johnston *et al.* 2009, Khaleghi *et al.* 2016). Syyt tälle erikoiselle reaktiolle ovat vielä pääosin epäselvät, mutta selitykseksi on tarjottu mm. suurien annosten mahdollisesti aiheuttamaa reseptorien desensitisoitua ja peptidiaggregaatiota.

Koko 12 viikkoisen lääketestin aikana, optimaalista 0.5mg lääkeannosta saavien koehenkilöiden keskuudessa raportoitiin mahasuolikanavan oireita keskimäärin 30 päivänä vähemmän verrattaessa muihin koeryhmiin (Leffer *et al.* 2015). Tämän tuloksen perusteella lääkkeen vaikutus todettiin kliinisesti merkittäväksi.

### 3. Nexvax 2

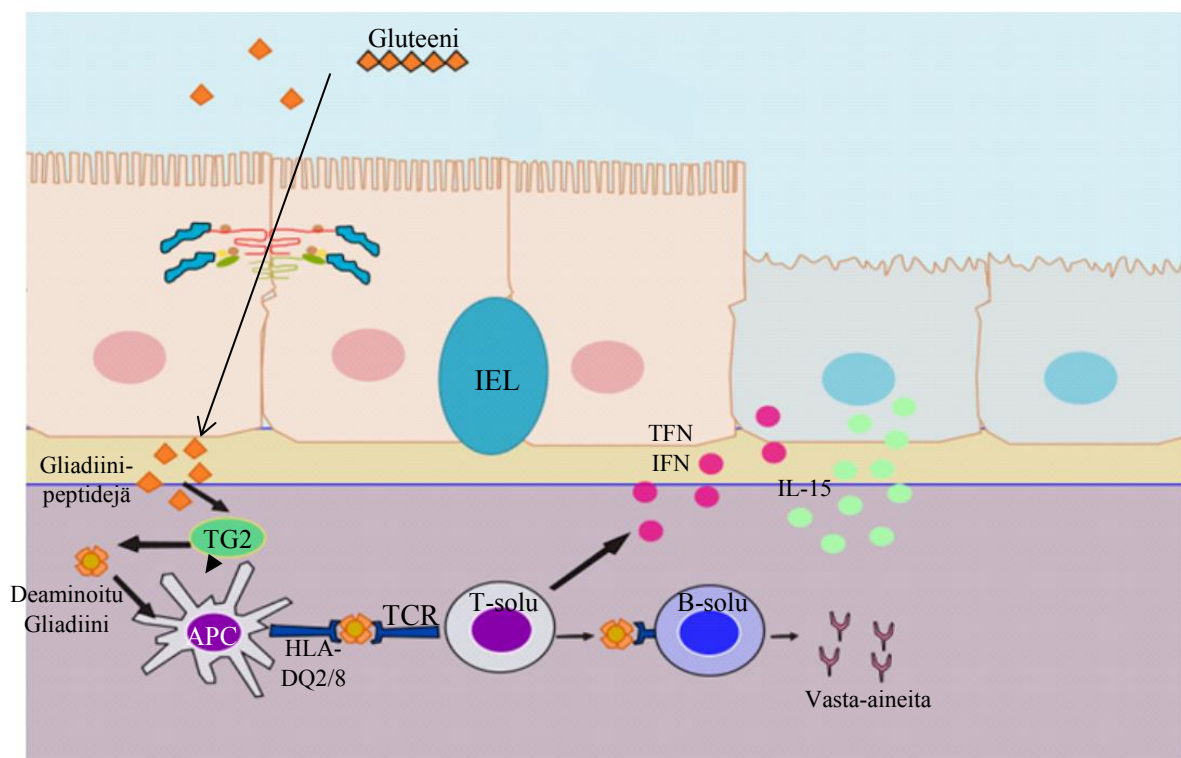
#### 3.1 Rakenne ja kuvaus

Nexvax2 on ImmusanT-yrityksen kehitteillä oleva antigeenipohjainen immunoterapia (ImmusanT 2018). Sen tarkoituksena on ehkäistä gluteenin nauttimisen jälkeiset kliiniset ja histologiset oireet keliakiaa sairastavilla potilailla. Terapiassa hyödynnetään peptidipohjaista, epitooppi-spesifiä terapeuttista rokotetta, jonka toimintaperiaate on sama kuin monissa allergioiden hoidoissa käytetyissä siedätyshoitoterapioissa (Durham *et al.* 1999). Perinteisesti kyseisten hoitojen tarkoituksena on auttaa kehoa palauttamaan pitkäaikainen sietokyky allergian aiheuttamaa allergeeniä vastaan, mutta saman hoitoperiaatteen on huomattu auttavan ehkäisemään ja hoitamaan immuunisairauksia kuten keliakiaa (Anderson 2013). Nexvax2 hyödyntää kolmea patentoitua, normaaliin suolaliuokseen liuotettua, synteettistä peptidiä; NPL001, NPL002 ja NPL003 (Daveson *et al.* 2017). Kaikki kolme peptidiä sisältävät 15-16 aminohappoa ja viisi gluteenipeptidiä, jotka HLA-DQ2.5-tyypin keliakiaa sairastavien potilaiden CD4<sup>+</sup> T-solujen on todettu tunnistamaan aktiivisimmin. Nämä gluteenipeptidit ovat  $\alpha$ -gliadiinista löytyvät DQ2.5-glia- $\alpha$ 1 ja DQ2.5-glia- $\alpha$ 2, DQ2.5-glia- $\omega$ 1 ja DQ2.5-glia- $\omega$ 2, jotka saadaan  $\omega$ -gliadiista, sekä DQ2.5-hor3 (Di Sabatino *et al.* 2018). Nämä peptidit ovat kykeneviä muokkaamaan keliakiaa sairastavan potilaan immuunisysteemin reaktiota gluteenia vastaan uudelleen ohjelmoimalla T-soluja, jotta ne eivät enää tuottaisi gluteenin vasta-aineita. Nexvax2:n tarkkana vaikutuksen kohteena on HLA-DQ2.5-geeni, jonka uskotaan olevan aiheuttajana 80-90% tunnetuista keliakia tapauksista, näin ollen tehden siitä tehottoman harvinaisempia taudinaiheuttajageenejä vastaan, kuten -DQ8 (ImmusanT 2018).

Vuoden 2017 kesällä, Nexvax2 oli saavuttanut lääkekehityksen toisen vaiheen ja sitä oli testattu pienimuotoisesti ihmisillä. Näiden tutkimusten perusteella lääke vaikuttaisi olevan täysin. On kuitenkin huomioitavaa, että liian suuren lääkeannoksen (yli 150 $\mu$ g) on huomattu aiheuttavan koehenkilöillä keliakialle tyypillisiä oireita (Di Sabatino *et al.* 2018).

### 3.2 Patogeneesi

Mahalaukussa sen pepsiniin hajottava gluteenin pienemmiksi peptideiksi, kuten gliadiini. Gliadiinit ovat muihin ravinnosta saatuihin ravinteisiin verrattuina suurikokoisia gluteenin korkean proliinipitoisuuden takia (Koning 2014). Ohutsuolessa nämä peptidit kykenevät sitoutumaan, joskin pienellä affiniteetillä, HLA-DQ2- ja HLA-DQ8-molekyyleihin, jotka virheellisesti esittävät ne stroomassa oleville CD4<sup>+</sup> T-soluille. Tämä saa aikaiseksi solujen aktivoitumisen ja käynnistää immuunipuolustusreaktion. Keliakian tapauksessa ohutsuolen T-solut alkavat tuottaa ylimääriä IL-15:ta, mikä johtaa tulehduksellisen tilan muodostumiseen. (Barker & Liu. 2008). Puolustakseen itseään gluteenilta, keliakikon keho alkaa tuottamaan TG2:n ja gliadiinin vastaisia vasta-aineita, jotka edistävät tulehduksen etenemistä ohutsuolen stroomassa. Tulehduksen seurauksesta suoleen muodostuva haavauma voidaan havaita potilaan verinäytteessä runsaana määränä IgA-plasmasoluja. Tästä syystä, keliakian voi helpoiten todeta anti-tTG2 vasta-aineiden muodostumisesta kehossa, joka voidaan havaita veressä etenkin IgA vasta-aineena (Kupfer & Jabri 2012).



**Kuva 5:** Ohutsuolen epiteelikudoksen läpi kulkeutuvat gliadiinipeptidit käynnistävät stroomassa immuunipuolustusreaktion, jonka seurauksesta kudokseen vapautuu suuria määriä sytokiineja: IFN ja TFN, sekä IL. Reaktiosta seuraava tulehdusreaktio vaurioittaa epiteelikudosta, jonka seurauksesta solujen ulkopuolelle pääsee vapautumaan tTG2:ta. tTG2 tehostaa gliadiinin deaminointia, jonka seurauksesta peptidit pääsevät sitoutumaan tehokkaammin APC:hen ja valkosolujen reagointi lisääntyy.

Kuva: Emma Viitanen & Wenny Santaniemi



Kudosvaurion muodostuessa tTG2-entsyymiä pääsee vapautumaan solujen ulkopuolelle. Normaalissa fysiologisissa olosuhteissa tTG2 tehtäisiin tehottomaksi hapettamalla se, mutta tulehduksen muodostuessa tTG2 pysyy aktiivisena myös solun ulkopuolella. Kudos-TG2-entsyymi kykenee deaminoimaan viljasta saadut peptidit, jolloin glutamiini muuntuu glutamiinihapoksi. Tämä saa molekyyliissä aikaan negatiivisia varauksia, jotka helpottavat niiden sitoutumisen APC-solujen (antigen-presenting cells) HLA-DQ2 ja -DQ8 molekyyliihin (Koning 2014, Kupfer & Jabri 2012). Kasvaneen sitoutumisen johdosta, gluteenispesifiset valkosolut reagoivat yhä enemmän HLA-DQ molekyylien kanssa, johtaen IL-15:n tuotannon kasvuun ja tulehduksen pahenemiseen suolistossa. Tulehduksen aikana ohutsuolessa alkaa myös muodostumaan tulehdusta edistäviä sytokiinejä, jotka edistävät paikallista tulehdusta. Näistä suurin vaikuttaja on IFN- $\gamma$  (Koning 2014). Ajan kanssa, IL-15 pitoisuuksien kasvu johtaa intraepiteelisten lymfosyyttien (IEL) aktivoitumiseen, jotka puolestaan aiheuttavat NKG2D reseptorien ja sen ligandin MICA:n ekspresion ja toiminnallisuuden tehostumiseen epiteelissä. Tämä aiheuttaa keliakialle tyypilliset epiteelisolvauriot. Tämän lisäksi IEL-soluille alkaa kehittymään NK-soluille tyypillisiä ominaisuuksia (Koning 2014).

### 3.3 Vaikutus

Kuten aiemmin todettiin, keliakikon nauttiessa gluteenia ohutsuolen CD4<sup>+</sup> T-solut reagoivat nautitusta gluteenista saatuihin gliadiinipeptideihin, käynnistäen näin kehossa vasta-aineiden tuotannon samaan tapaan kuin patogeenin kohdalla johtaen tulehdukseen ohutsuolessa (Daveson *et al.* 2017). On kuitenkin havaittu, että saatuaan annoksen tiettyjä synteettisiä peptidejä, ohutsuolen gluteenispesifiset CD4<sup>+</sup> T-solut, joita on pitkäkestoisesti altistettu antigeenireseptorin tunnistamalle epitoopille, menettävät kykynsä reagoida myöhäisempiin antigeenikontakteihin. Myöhemmin, reagoimattomat T-solut ovat joissain tapauksissa hävinneet koehenkilön kehosta kokonaan tai muuntuneet anergisiksi (Daveson *et al.* 2017). Nexvax2 vaikuttaa suoraan ohutsuolen alaisiin muisti-T-soluihin, jotka reagoivat HLA-DQ2:n kanssa. Lääke estää T-soluja tuottamasta tulehdusreaktion laukaisevia sytokiineja samaan tapaan kuin gluteenin poisjättäminen potilaan ruokavaliosta luonnollisesti tekisi. Koska rokote on spesifinen gliadiinipeptidille, sen vaikutus ei aiheuta muutoksia potilaan immuunipuolustukseen muutoin kuin kehittämällä vastustuskykyä gluteeniin reagoivissa T-soluissa (Di Sabatino *et al.* 2018). Valitettavasti immuunisolujen luonnollinen uusiutuminen johtaa rokotteen vaikutuksen heikkenemiseen ja katoamiseen ajan mittaan (Daveson *et al.* 2017, Ludvigsson *et al.*

2018b). Tästä syystä lääkehoitoa saavien potilaiden täytyisi ottaa tehosterokote tasaisin väliajoin vastustuskynsä säilyttämiseksi.

Nexvax2:lla vaikuttaisi olevan positiivinen vaikutus potilaan gluteeninsietokykyyn. Eräissä tutkimuksissa vapaaehtoiset koehenkilöt altistettiin kahdeksan viikon ajan kahdesti viikossa annettuihin lääkeinjektioihin (Daveson *et al.* 2017). Koehenkilöt oli jaettu kahteen erilliseen ryhmään, joista toiset saivat lääkeainetta 150 µg ja toiset 300 µg. Injektion jälkeen Nexvax2:n havaittiin aiheuttavan keliakialle tyypillisiä vatsaoireita koehenkilöissä noin 2-5 tunnin sisään lääkkeelle altistumisesta, vaikka koehenkilöt eivät olleet nauttineet gluteenia tällä aikavälillä. Lisäksi verinäytteissä havaittiin taudinkuvaan sopivien IL-arvojen nousua, joihin kuuluvat mm. IL-6, IL-2 ja IL-10. Suurin osa keliakian oireista ilmoittaneista koehenkilöistä kuuluivat 300 µg lääkeannoksen saavaan ryhmään. Oireiden määrä kuitenkin väheni kaikilla koehenkilöillä tutkimuksen edetessä, viitaten kasvaneeseen sietokykyyn ja hoidon toimivuuteen (Daveson *et al.* 2017). Kokeen loppuvaiheen testeissä koehenkilöissä ei myöskään havaittu merkkejä keliakialle tyypillisiä vasta-aineista kuten anti-tTG:sta, anti-gliadiineista tai deaminoiduista peptideistä. Myöskään Nexvax2:een kohdistuvista vasta-aineista ei havaittu (Di Sabatino *et al.* 2018). Kokeen aikana koehenkilöille suoritettiin kaksi tähtystytutkimusta 15 ja 28 päivän kohdilla. Kummassakaan 150µg tai 300µg ryhmässä ei havaittu muutoksia ohutsuolen morfologiassa tai lymfosyyttiheydessä.

## **4. Latiglutenase**

### **4.1 Rakenne ja kuvaus**

Latiglutenaasi (tunnetaan myös nimillä IMGX003 ja ALV003) on lääkeyhtiö ImmunogenX:n kehitteillä oleva suun kautta nautittava, entsyymipohjainen lääkeaine (ImmunogenX. 2018, Syage *et al.* 2017). Lääke sisältää kahta muokattua gluteenispesifistä rekombinanttiproteaasia: kysteini-endoproteaasi B-isoformi 2:ta (EP-B2) ja prolyyli endopeptidaasia (PE tai PEP). Sen tähtäimenä on pilkkoa potilaan nauttima gluteeni näiden kahden entsyymin avulla pienemmiksi molekyyleiksi, joilla ei ole vaikutusta keliakian oireet laukaiseviin tekijöihin (Syage *et al.* 2017).

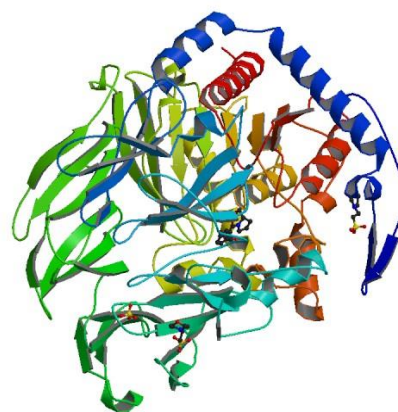
Lääkkeen toinen vaikuttavista aineista, EP-B2 on alun perin ohran vihreästä maltaasta eristetty glutamiinispesifinen kysteiiniendoproteaasi, joka hajottaa gluteenia ohran jyvävaiheessa. EP-B2:ta voidaan kuitenkin löytää myös muistakin yleisimmistä ruokaviljoista (Vora *et al.* 2007). Proteiini muodostuu viljan jyvän kuorikerroksen alta löytyvissä aleurone-soluissa gibberellihapon stimuloimalla niitä (UniProt 2018). Aiemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että EP-B2 itsessään kykenee helpottamaan keliakalle tyypillisiä oireita, sillä sen on havaittu pilkkovan gluteenia vatsassa ja ohutsuolessa (Bethune *et al.* 2006). Esimerkiksi rottakokeissa huomattiin, että 1:25 EP-B2/gluteeniannoksen saadessaan, 33-mer gliadiinipeptidien konsentraation koe-eläinten suolistossa laski yli 50 kertaiseksi 90 minuutin aikana annoksen saannista. Koe-eläimet eivät myöskään osoittaneet selkeitä keliakialle tyypillisiä myrkytysoireita (Gass *et al.* 2006). EP-B2 on kooltaan lähteestä riippuen 262 (Bethune *et al.* 2006) tai 373 (UniProt 2018) aminohappoa ja muodostuu neljästä erillisestä ketjusta, joista kaksi ovat uniikkeja. EP-B2:n molekyyli paino on noin 113.6 kDA (Bethune *et al.* 2006). Molekyyliässä on lisäksi kolme erillistä rikkisidosta ja N-sidottu asparagiinia.



**Kuva 6:** Ohran EP-B2-proteiini leupeptiinin kanssa

PDB ID:2F5O  
(Bethune *et al.* 2006)

Latiglutenaasin PEP on myöskin luonnollisesti gluteenia pilkkova molekyyli, mutta saman ryhmän proteiineja käytetään myös yleisinä terapeuttisina agentteina (Gass & Khosla 2007). PEP on suuri, noin 689 aminohapon kokoinen, molekyyli (UniProt 2018). Se on ihmisen sytosolista löytyvä seriini-peptidaasi, joka kykenee pilkkomaan peptidejä niiden sisäisäisten proliinitähteiden kautta (Gass & Khosla 2007). Ensimmäiset PEP-ryhmän proteiinit löydettiin ihmisen kohdusta, missä niiden havaittiin kykenevän pilkkomaan oksitosiinien prolyni-leusiinipeptidisidoksia. PEP esiintyy kuitenkin yleisimmin erilaisissa mikro-organismeissa, joissa sen tehtävänä on pilkkoa immuunidominanteja, proliinirikkaita alueita (Schuppan *et al.* 2009). PEP-rakenteen tarkemmassa tutkimuksessa havaittiin sille uniikki seitsenteräinen (se-



**Kuva 7:** Poryyli Endopeptidaasi

PDB: 2BKL  
(Shan *et al.* 2005)

ven-blade)  $\beta$ -potkuri domeiini.  $\beta$ -potkuri domeiinin tehtävät vaikuttaisivat olevan osa saapuvien peptidien suodatusta ja niiden pilkkomista yhteistyössä peptidaasi-domeiinin kanssa (Gass & Khosla 2007).

Aiemmissa lääkekokeissa PEP:lla on havaittu olevan alentava vaikutus keliakialle tyypillisen immuunipuolustusreaktiota stimuloivien peptidien, gliadiinien, määrään ja vähentävän niiden immunogeenisiä vaikutuksia suoliston T-solulinjoja kohtaan. PEP:n on myös huomattu auttavan rasvan ja hiilihydraattien imeytymistä potilailla gluteenivapaan dieetin aikana (Pyle, GG *et al.* 2005). Lisäksi joidenkin neurologiset sairauksien, kuten Alzheimerin ja skitsofrenian sekä masennuksen ja muiden sairauksien, kuten verenpaineen ja anoreksian on havaittu olevan yhteydessä kehon PEP-aktiivisuuden kanssa (Gass & Khosla 2007).

Latiglutenaasi on stabiili pH väleillä 3.5-5, mikä mahdollistaa sen selviämisen mahalaukussa ruokailun jälkeen. Lääkeaine ei myöskään absorboitu juurikaan vatsassa, jolloin suurin osa lääkeaineesta päätyy ohutsuoleen (Gass & Khosla 2007).

## 4.2 Patogeneesi

Suurin osa ohutsuolen lumenin saavuttavista proteiineista pilkkoontuvat mahalaukun pepsiinin ja haiman proteaasien vaikutuksesta. Suoliston omat entsyymit jatkavat tätä reaktiota, kunnes jäljelle jää vain yksittäisiä aminohappoja tai di- ja tripeptidejä (Schuppan *et al.* 2009). Muista proteiineista poiketen, gluteeni on hyvin resistenssi ihmisen ruuansulatuksen proteaaseja kohtaan. Tämä johtuu siitä, että gliadiinipeptidit sisältävät suuria määriä proliinitähteitä. Lisäksi gliadiinien vaatima pitkä pilkkoutumisaika vaikeuttavat niiden hajottamista suolistossa.

Gluteenin hajoamista ruuansulatuksessa voidaan helpottaa erillisten suullisesti nautittujen lisäentsyymien avulla. Latiglutenaasi perustuu juuri tällaiseen entsyymi täydennysterapiaan (Syage *et al.* 2017). Lääkkeen vaikutus tehostaa huonosti pilkkoutuneiden, immunotoksisten gluteeni peptidien hajottamista potilaan vatsassa. Tällöin haitalliset peptidit eivät joudu kosketuksiin ohutsuolen limakalvon immuunipuolustuksen kanssa. Lääkkeen entsyymit vaikuttavat pääasiassa gluteenissa yleisiin glutamiini- ja proliini-osiin (Gass *et al.* 2006).

Kuten aiemmin todettiin, Latiglutenaasin vaikuttavina aineina toimivat PEP ja EP-B2 kykenevät itsenäisesti pilkkomaan keliakiassa haitallisia proliineja ja molemmille suoritetuissa kokeissa on ha-

vaittu vähentävän sairaudelle tyypillisiä oireita (Pyle, GG *et al.* 2005). PEP:n on myös havaittu vähentävän rasvan imeytymishäiriöitä. Yksittäisille entsyymeille suoritettujen kokeiden perusteella kuitenkin havaittiin, että PEP:n herkkyysarvot ja teho, jotka pohjattiin D-ksyloosin absorboimiseen sekä ulosteen rasvapitoisuuteen, olivat liian matalat selkeän yhteenvedon luomiseksi (Schuppan *et al.* 2009). Substraattien pituus ja aktiivisuusmaksimi tietyssä pH:ssa, joka vaihtelee lähde mikro-organismissa riippuen, arvioitiin mahdollisiksi tekijöiksi, jotka rajoittavat PEP:n tehokkuutta.

Kun *S capsulata*:sta eristetty PEP yhdistettiin glutamiinispesifisen EP-B2-proteaasin kanssa, gluteeni kyettiin pilkkomaan kokonaan molemmissa *in vitro* ja rotille tehdyissä *in vivo* kokeissa. Verratessa gluteeni-spesifisiin T-solulinjoihin, yhdisteen havaittiin vähentävän myös gluteenin immuunigeneettistä potentiaalia (Schuppan *et al.* 2009).

Latiglutenaasissa käytetyt muokatut versiot SC-PEP- ja EP-B2-entsyymeistä kykenevät hajottamaan gluteenia nopeammin ja perusteellisemmin kuin yksittäinen, ei muokattu entsyymi (Lähdeaho *et al.* 2014).

### 4.3 Vaikutus

Latiglutenaasi on lääketestauksessa vasta hyvin varhaisessa vaiheessa ja toisen vaiheen tutkimuksia ei ole juurikaan julkaistu. Viimeisin faasi II:n koe alkoi syyskuussa 2018 ja sen arvioidaan valmistuvan 2020 (ClinicalTrials.gov 2018).

Vuonna 2014 julkaistussa tutkimuksessa Latiglutenaasi antoi lupaavia tuloksia. Suomessa suoritettut kokeet noin 40:lle keliakiaa sairastavalle potilaalle osoittivat, että Latiglutenaasi (tuolloin ALV003) vähensi gluteenin aiheuttamia ohutsuolen limakalvon vaurioita plasebo-ryhmään verrattuna 6 viikkoa kestäneen gluteenistressikoejakson aikana (Lähdeaho *et al.* 2014). Koe oli kaksivaiheinen, joista ensimmäisessä koehenkilöt altistettiin eri määriä gluteenia (1,5g, 3g ja 6g), mutta kaikki potilaat saivat saman 900 mg annoksen Latiglutenaasia. Kokeen toisessa vaiheessa 2 g päivittäistä gluteenirasitetta verrattiin plasebo-ryhmää.

Kokeen jälkeisissä VH:CrD-arvoissa todettiin tilastollisesti merkittävä eroavaisuus plasebo-ryhmän ja Latiglutenaasia saavien koehenkilöiden välillä (Lähdeaho *et al.* 2014). Myös T solujen tiheydessä havaittiin huomattavasti matalampia arvoja lääkeainetta ottavien keskuudessa. Tutkimuksessa myös määritettiin, että ihanteellinen gluteenimäärä 900 mg Latiglutenaasia kohden on 2 g gluteenia päivää

kohden. Tämä käsittäisi noin yhden kymmenesosan osan länsimaalaisen ruokavalion keskimääräisestä päivittäisestä gluteenin saannista. Arvo on kuitenkin 100-kertainen verrattaessa keliakikolle turvalliseen päivittäiseen gluteeniannokseen (Syage *et al.* 2017). Kokeiden aikana, jo 1,5g gluteenia päivässä altistetussa ryhmässä havaittiin huomattavaa limakalvon heikkenemistä (Lähdeaho *et al.* 2014). Oireet vaikuttivat kuitenkin olevan koehenkilölle siedettävällä tasolla. On kuitenkin otettava huomioon, että keliakialle tyypillisten vasta-aineiden - TG2, IgA, EMA ja DGP- arvoissa ei esiintynyt merkittäviä eroavaisuuksia eri ryhmien välillä. Osa koehenkilöistä joutui lisäksi keskeyttämään kokeet sietämättömistä keliakialle tyypillisistä oireista kuten vatsakivuista, oksentelusta ja pahoinvoinnista johtuen. Muutaman koehenkilön tapauksessa tutkijat keskeyttivät kokeen liian laajalle levinneestä tulehduksesta johtuen.

2017 julkaistun tutkimuksen perusteella Latiglutenaasilla ei ole huomattavaa vaikutusta ohutsuolen mikrovillusten surkastumisen estämiseen (Murray *et al.* 2017). Tutkimus suoritettiin aiempaa julkaisua suuremmalla populaatiolla ja koehenkilöt olivat useasta eri maasta. Tutkimuksen tarkoituksena oli vertailla vaihtelevien Latiglutenaasi-annosten (100, 300, 450, 600 ja 900mg) vaikutusta tutkimuksesta epäselväksi jääneeseen gluteeniannokseen. 12 viikkoa kestäneen tutkimuksen aikana ja sen jälkeen mitatut VH:CrD, CD3+, IEL ja vasta-ainearvot eivät osoittaneet plasebo-ryhmään verrattuna tilastollisesti merkittävää parannusta. Koehenkilöiden pitämästä oirepäiväkirjasta (CDSD, celiac disease symptom diary) kuitenkin havaittiin tilastollisesti merkittävää vatsakipujen, turvotuksen sekä väsymyksen vähenemistä ja heikkenemistä niiden koehenkilöiden keskuudessa, jotka saivat suuren annostuksen Latiglutenaasia (600 ja 900mg). Tämän perusteella on mahdollista, että Latiglutenaasi vaikuttaa ensiksi keliakian oireisiin, ennen merkittäviä histologisten ja serologisten arvojen muutoksia (Murray *et al.* 2017). Hypoteesia tukee saman tyyppinen kehitys uusilla potilailla, jotka aloittavat gluteenivapaan dieetin noudattamisen keliakian toteamisen jälkeen (Lee *et al.* 2003, Murray *et al.* 2004).

Myöhemmin samana vuonna julkaistussa tutkimuksessa havaittiin, että Latiglutenaasi vaikutti tehokkaammin seropositiivisiin koehenkilöihin (Syage *et al.* 2017). Tällä tarkoitetaan potilaita, joiden verestä havaittiin ennen kokeen alkua keliakialle tyypillisiä vasta-aineita; TG2, IgA, IgG ja DGP. Tutkimuksessa käytetty data oli peräisin aiemmin julkaistusta tutkimuksesta (Murray *et al.* 2017). 12 viikon aikana koehenkilöt kertoivat huomattavista vatsakipujen vakavuuden ja turvotuksen vähene misestä. Kokeen lopussa vatsakipujen RIS<sub>dose</sub> arvot olivat lääkannoksesta riippuen 24-58% plasebo ryhmää paremmat, kun taas turvotus helpotti 3-44% (Syage *et al.* 2017). Molemmissa tapauksissa

900mg lääkeannos antoi parhaat tulokset. Lisäksi 600 ja 900mg ryhmissä havaittiin 31-54% parannus väsymyksessä plasebo-ryhmään verrattuna. Ripulissa ja pahoinvoinnissa ei havaittu merkittävää parannusta Latiglutenaasia ottavien koehenkilöiden keskuudessa.

## 5. Yhteenveto

Kaikki kolme tutkielmassa mainittua lääkeainetta esittävät lupaavia tuloksia mahdollisen lääkehoidon käyttöön saamiseksi seuraavan kymmenen vuoden aikana. Jotkin niistä, kuten Latiglutenaasi ja LA soveltuvat kuitenkin paremmin tukemaan potilaan gluteenitonta dieettiä kuin suoraanaisina korvaavina hoitokeinoina. Esimerkiksi LA:n kohdalla lääkkeen käyttöä hankaloittaa etenkin se, että lääke tulee ottaa ennen gluteenille altistumista. Myös LA:n käänteinen annosvaikutus hankaloittaa lääkkeen annostelua, mistä johtuen se ei välttämättä sovellu kaikille potilaille. Lisäksi LA:n kohdalla on otettava huomioon, että suoliston parasellulaarinen läpäisevyys kasvaa keliakian edetessä (Khaleghi *et al.* 2016). Tämän perusteella on hyvin mahdollista, että LA:n vaikutuksen teho on huomattavasti heikentynyt keliakiaa pitkäaikaisesti sairastavien potilaiden keskuudessa. LA vaikuttaisi kuitenkin olevan hyvin lupaava hoito keliakikoille, jotka tietävät etukäteen joutuvansa tilanteeseen, jossa gluteenille altistuminen on mahdollista, tai tahtovat nauttia gluteenia sisältäviä tuotteita satunnaisesti.

Latiglutenaasin kohdalla suurin ongelma on se, kuinka pieneen määrään gluteenia lääkeaine näyttäisi vaikuttavan. Kuten aiemmin todettiin, tämän hetkinen ideaali 900mg lääkeannos näyttäisi kykenevän vaikuttamaan 2 g gluteenia, joka on vain kymmenesosa länsimaisen ruokavalion tyypillisestä gluteenin päiväsaannista. Tämän perusteella Latiglutenaasi soveltuu todennäköisimmin parhaiten tilanteisiin, jolloin potilas altistuu tuotteille, jotka saattavat sisältää pieniä määriä gluteenia tai ovat joutuneet kosketuksiin gluteenia sisältävien tuotteiden kanssa, mikä voi olla yleistä esimerkiksi ravintoloissa. Lääke vaikuttaisi kuitenkin helpottavan keliakian oireita, joita esiintyvät myös gluteenittoman dieetin aikana ja on mahdollista, että lääkkeen pitkäaikaisella käytöllä on positiivinen vaikutus ohutsuolen histologiseen tilaan.

Potilaille, jotka toivovat päästä eroon gluteenivapaasta ruokavaliosta, Nexvax2 vaikuttaisi olevan suotuisin vaihtoehto. Lääkkeen suurin ongelma on kuitenkin se, että se toimii ainoastaan tietyn geenin omaavilla potilailla, ja näin ollen hyödytön noin 5% keliakiaa sairastavista. Lisäksi tutkimuksista jäi

epäselväksi, kuinka usein tehosterokote tulisi ottaa kahdeksan viikkoa kestäneen alkuhoidon jälkeen. Lisäksi ongelmiksi voi osoittautua mahdolliset pidemmän aikajakson katkokset injektioiden välillä sairauden tai muun syyn johdosta, jolloin potilas joutuu aloittamaan tehohoidon alusta. On myös otetta huomioon, että injektio ei ole kaikille potilaille mieluisa ajatus ja voi vaikuttaa suuresti heidän päätökseensä käyttää lääkettä. Lisäksi Nexvax2:n kohdalla on hyvin mahdollista, että lääke päättyy olemaan kallis, eikä näin ollen kaikkien halukkaiden potilaiden saatavilla.

Nämä kolme lääketutkimusta, sekä lukuisat muut tutkimukset keliakian hoitoon soveltuvan lääkeaineen löytämiseksi vaikuttavat erittäin lupaaville. Lääkkeen markkinoille saanti tulee huomattavasti helpottamaan keliaakikkojen jokapäiväistä elämää, etenkin niiden potilaiden keskuudessa, jotka saavat oireita jo hyvin pienistä määristä gluteenia. Suomessa lääkkeen löytyminen voi myös mahdollisesti avata uudelleen keskustelun KELA:n tarjoaman rahallisen avustuksen palauttamiseksi, josta luovuttiin vuoden 2015 lopussa. On kuitenkin muistettava, että pisimmälle edennyt tutkimus on vasta lääkekehityksen kliinisen vaiheen toisessa faasissa. Näin ollen lääkehoidon saaminen markkinoille ja potilaiden käyttöön tulee viemään vielä vuosia.



## 6. Läheteet

- Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB & Jabri B (2011) Integration of Genetic and Immunological Insights into a Model of Celiac Disease Pathogenesis. *Annual Review of Immunology* 29(1): 493-525.
- Akobeng AK, Ramanan AV, Buchan I & Heller RF (2006) Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Archives of disease in childhood* 91(1): 39-43.
- Anderson RP, Bana (2013) Vaccine against autoimmune disease: antigen-specific immunotherapy. *Current Opinion in Immunology* 25(3): 410-417.
- Barker JM & Liu E (2008) Celiac Disease: Pathophysiology, Clinical Manifestations and Associated Autoimmune Conditions. *Adv Pediatr* 55: 349-365.
- Belzen v, MJ, Koeleman BP, Crusius JBA, Meijer JW, Bardoel AF, Pearson PL, Sandkuijl LA, Houwen RH & Wijmenga C (2004) Defining the contribution of the HLA region to cis DQ2-positive coeliac disease patients. *Genes and Immunity* 5(3): 215-220.
- Bethune MT, Strop P, Tang Y, Sollid LM & Khosla C (2006) Heterologous expression, purification, refolding, and structural-functional characterization of EP-B2, a self-activating barley cysteine endoprotease. *Chem Biol* 13(6): 637-647.
- Bethune MT, Strop P, Tang Y, Sollid LM & Khosla C. (2006) Heterologous expression, purification, refolding, and structural-functional characterization of EP-B2, a self-activating barley cysteine endoprotease. *Chem Biol* 13(6): 637-647.
- Beyond Celiac (2018) Drug Development Pipeline | BeyondCeliac.org. 2018(Nov 21).
- Bouziat R, Hinterleitner R, Brown JJ, Stencel-Baerenwald JE, Ikizler M, Mayassi T, Meisel M, Kim SM, Discepolo V, Pruijssers AJ, Ernest JD, Iskarpatyoti JA, Costes LMM, Lawrence I, Palanski BA, Varma M, Zurenski MA, Khomandiak S, McAllister N, Aravamudhan P, Boehme KW, Hu F, Samsom JN, Reinecker H, Kupfer SS, Guandalini S, Semrad CE, Abadie V, Khosla C, Barreiro LB, Xavier RJ, Ng A, Dermody TS & Jabri B (2017) Reovirus infection triggers inflammatory responses to dietary antigens and development of celiac disease. *Science* 356(6333): 44-50.
- Chey WD, Lembo AJ, Lavins BJ, Shiff SJ, Kurtz CB, Currie MG, MacDougall JE, Jia XD, Shao JZ, Fitch DA, Baird MJ, Schneier HA & Johnston JM (2012) Linaclotide for irritable bowel syndrome with constipation: a 26-week, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate efficacy and safety. *Am J Gastroenterol* 107(11): 1702-1712.
- ClinicalTrials.gov (2018) Latiglutenase as a Treatment for Celiac Disease - Full Text View - ClinicalTrials.gov. 2018 (Nov 30,).
- Daveson AJM, Ee HC, Andrews JM, King T, Goldstein KE, Dzuris JL, MacDougall JA, Williams LJ, Treohan A, Cooreman MP & Anderson RP (2017) Epitope-Specific Immunotherapy Tar-

getting CD4-Positive T Cells in Celiac Disease: Safety, Pharmacokinetics, and Effects on Intestinal Histology and Plasma Cytokines with Escalating Dose Regimens of Nexvax2 in a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 1 Study. *EBioMedicine* 26: 78-90.

Di Sabatino A, Lenti MV, Corazza GR & Gianfrani C (2018) Vaccine Immunotherapy for Celiac Disease. *Front Med* 5: 187.

Dias JA (2017) Celiac Disease: What Do We Know in 2017? *GE Portuguese Journal of Gastroenterology* 24(6): 275.

Durham SR, Walker SM, Varga EM, Jacobson MR, O'Brien F, Noble W, Till SJ, Hamid QA & Nouri-Aria KT (1999) Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N Engl J Med* 341(7): 468-475.

Fasano Alessio (2016) Genetics of Celiac Disease: Overview, Clinical Implications, Genetic Testing.

Gass J & Khosla C (2007) Prolyl endopeptidases. *Cell Mol Life Sci* 64(3): 345-355.

Gass J, Vora H, Bethune MT, Gray GM & Khosla C (2006) Effect of Barley Endoprotease EP-B2 on Gluten Digestion in the Intact Rat. *J Pharmacol Exp Ther* 318(3): 1178-1186.

Gopalakrishnan S, Durai M, Kitchens K, Tamiz AP, Somerville R, Ginski M, Paterson BM, Murray JA, Verdu EF, Alkan SS & Pandey NB (2012) Larazotide acetate regulates epithelial tight junctions in vitro and in vivo. *Peptides* 35(1): 86-94.

Gopalakrishnan S, Tripathi A, Tamiz AP, Alkan SS & Pandey NB (2012) Larazotide acetate promotes tight junction assembly in epithelial cells. *Peptides* 35(1): 95-101.

ImmunogenX (2018) Science | ImmunogenX.

ImmusanT (2018) Clinical development - Celiac Disease Programs. 2018 (21.6.)

Ivarsson A, Hernell O, Nystrom L & Persson L (2003) Children born in the summer have increased risk for coeliac disease. *J Epidemiol Community Health* 57: 36.

Johnston JM, Kurtz CB, Drossman DA, Lembo AJ, Jeglinski BI, MacDougall JE, Antonelli SM & Currie MG (2009) Pilot study on the effect of linaclotide in patients with chronic constipation. *Am J Gastroenterol* 104(1): 125-132.

Khaleghi S, Ju JM, Lamba A & Murray JA (2016) The potential utility of tight junction regulation in celiac disease: focus on larazotide acetate. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 9(1): 37-49.

Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, Han L, He J, He S, Shoemaker BA, Wang J, Yu B, Ehang J & Bryant SH (2009) Larazotide acetate CID=44146842 2018(Nov 25,).

Koning F (2014) Pathophysiology of Celiac Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 59: S1.

- Koning F (2014) Pathophysiology of Celiac Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 59: S1.
- Kupfer SS & Jabri B (2012) Celiac Disease Pathophysiology. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 22(4).
- Lähdeaho M, Kaukinen K, Laurila K, Vuotikka P, Koivurova O, Kärjä-Lahdensuu T, Marcantonio A, Adelman DC & Mäki M (2014) Glutenase ALV003 attenuates gluten-induced mucosal injury in patients with celiac disease. *Gastroenterology* 146(7): 1649-1658.
- Lammers KM, Lu R, Brownley J, Lu B, Gerard C, Thomas K, Rallabhandi P, Shea-Donohue T, Tamiz A, Alkan S, Netzel-Arnett S, Antalis T, Vogel SN & Fasano A (2008) Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology* 135(1): 204.e3.
- Lee SK, Lo W, Memeo L, Rotterdam H & Green PHR (2003) Duodenal histology in patients with celiac disease after treatment with a gluten-free diet. *Gastrointest Endosc* 57(2): 187-191.
- Leffer DA, Kelly CP, Green P, Fedorak R, DiMarino A, Perrow W, Rasmussen H, Wang C, Bercik P, Bachir N & Murray J (2015) Larazotide Acetate for Persistent Symptoms of Celiac Disease Despite a Gluten-Free Diet: A Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology* 148(7): 1319.e6.
- Lionetti E, Castellaneta S, Francavilla R, Pulvirenti A, Tonutti E, Amarri S, Barbato M, Barbera C, Barera G, Bellantoni A, Castellano E, Guariso G, Limongelli MG, Pellegrino S, Polloni C, Ughi C, Zuin G, Fasano A & Catassi C (2014) Introduction of gluten, HLA status, and the risk of celiac disease in children. *N Engl J Med* 371(14): 1295-1303.
- Losowsky MS (2008) A History of Coeliac Disease. *DDI* 26(2): 112-120.
- Ludvigsson JF, Ciacci C, Green PH, Kaukinen K, Korponay-Szabo IR, Kurppa K, Murray JA, Lundin KEA, Maki MJ, Popp A, Reilly NR, Rodriguez-Herrera A, Sanders DS, Schuppan D, Sleet S, Taavela J, Voorhees K, Walker MM & Leffler DA (2018) Outcome measures in coeliac disease trials: the Tampere recommendations. *Gut* 67(8): 1410-1424.
- Ludvigsson JF, Ciacci C, Green PH, Kaukinen K, Korponay-Szabo IR, Kurppa K, Murray JA, Lundin KEA, Maki MJ, Popp A, Reilly NR, Rodriguez-Herrera A, Sanders DS, Schuppan D, Sleet S, Taavela J, Voorhees K, Walker MM & Leffler DA (2018) Outcome measures in coeliac disease trials: the Tampere recommendations. *Gut* 67(8): 1410-1424.
- Molberg O, Kett K, Scott H, Thorsby E, Sollid LM & Lundin K (1997) Gliadin specific, HLA DQ2-restricted T cells are commonly found in small intestinal biopsies from coeliac disease patients, but not from controls. *Scandinavian Journal of Immunology* 46(1): 103-108.
- Molberg Ø, Solheim Flaete N, Jensen T, Lundin KEA, Arentz-Hansen H, Anderson OD, Kjersti Uhlen A & Sollid LM (2003) Intestinal T-cell responses to high-molecular-weight glutenins in celiac disease. *Gastroenterology* 125(2): 337-344.

- Murray JA, Kelly CP, Green PHR, Marcantonio A, Wu T, Mäki M & Adelman DC (2017) No Difference Between Latiglutenase and Placebo in Reducing Villous Atrophy or Improving Symptoms in Patients With Symptomatic Celiac Disease. *Gastroenterology* 152(4): 798.e2.
- Murray JA, Watson T, Clearman B & Mitros F (2004) Effect of a gluten-free diet on gastrointestinal symptoms in celiac disease. *Am J Clin Nutr* 79(4): 669-673.
- Mustajoki P (2017) Keliakia. 2018 (Feb 10).
- Myléus A, Hernell O, Gothefors L, Hammarström M, Persson L, Stenlund H & Ivarsson A (2012) Early infections are associated with increased risk for celiac disease: an incident case-referent study. *BMC Pediatr* 12: 194.
- Niida A, Hiroko T, Kasai M, Furukawa Y, Nakamura Y, Suzuki Y, Sugano S & Akiyama T (2004) DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the  $\beta$ -catenin/TCF pathway. *Oncogene* 23(52): 8520-8526.
- Orion (2018) Drug development. 2018 (Nov 21).
- Paterson BM, Lammers KM, Arrieta MC, Fasano A & Meddings JB (2007) The safety, tolerance, pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of single doses of AT-1001 in coeliac disease subjects: a proof of concept study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 26(5): 757-766.
- Ploski R, Ek J, Thorsby E & Sollid LM (1993) On the HLA-DQ(alpha 1\*0501, beta 1\*0201)-associated susceptibility in celiac disease: a possible gene dosage effect of DQB1\*0201. *Tissue Antigens* 41(4): 173-177.
- Plot L & Amital H (2009) Infectious associations of Celiac disease. *Autoimmun Rev* 8(4): 316-319.
- Prifer (2015) Uusi lääke on 12–16 vuoden työn tulos. 2018 (Nov 21).
- Pyle GG, Paaso B, Anderson BE, Allen DD, Marti T, Li Q, Siegel M, Khosla C & Gray GM (2005) Effect of pretreatment of food gluten with prolyl endopeptidase on gluten-induced malabsorption in celiac sprue. *Clin Gastroenterol Hepatol* 3(7): 687-694.
- Pyle GG, Paaso B, Anderson BE, Allen D, Marti T, Khosla C & Gray GM (2005) Low-dose gluten challenge in celiac sprue: malabsorptive and antibody responses. *Clin Gastroenterol Hepatol* 3(7): 679-686.
- Schuppan D, Junker Y & Barisani D (2009) Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology* 137(6): 1912-1933.
- Syage J, Murray J, Green P & Khosla C (2017) Latiglutenase Improves Symptoms in Seropositive Celiac Disease Patients While on a Gluten-Free Diet. *Dig Dis Sci* 62(9): 2428-2432.
- Tennyson CA, Simpson S, Lebwohl B, Lewis S & Green PHR (2013) Interest in medical therapy for celiac disease. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 6(5): 358-364.
- Torjesen Ingrid (2015) Drug development: the journey of a medicine from lab to shelf. 2018(Nov 21).

UniProt (2018) UniProtKB - P25250 (CYSP2\_HORVU). 2018(23.9.)

UniProt (2018) UniProtKB - Q9X5N2 (Q9X5N2\_MYXXA). 2018(17.10.)

van der Merwe, Jacques Q., Hollenberg MD & MacNaughton WK (2008) EGF receptor transactivation and MAP kinase mediate proteinase-activated receptor-2-induced chloride secretion in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294(2): 441.

Vora H, McIntire J, Kumar P, Deshpande M & Khosla C (2007) A scaleable manufacturing process for pro-EP-B2, a cysteine protease from barley indicated for celiac sprue. *Biotechnology and Bioengineering* 98(1): 177-185.

Vriezinga SL, Auricchio R, Bravi E, Castillejo G, Chmielewska A, Crespo Escobar P, Kolaček S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, Mummert E, Polanco I, Putter H, Ribes-Koninckx C, Shamir R, Szajewska H, Werkstetter K, Greco L, Gyimesi J, Hartman C, Hogen Esch C, Hopman E, Ivarsson A, Koltai T, Koning F, Martinez-Ojinaga E, te Marvelde C, Pavic A, Romanos J, Stoopman E, Villanacci V, Wijmenga C, Troncone R & Mearin ML (2014) Randomized feeding intervention in infants at high risk for celiac disease. *N Engl J Med* 371(14): 1304-1315.